TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR HEMMUNG DES HYALURONIDASE-SPREADING DURCH INDOMETACIN IN VERSCHIEDENEN DOSIERUNGEN

von

Ingeborg Schürnbrand

1967

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität
München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR HEMMUNG DES HYALURONIDASE-SPREADING DURCH INDOMETACIN IN VERSCHIEDENEN DOSIERUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Ingeborg Schürnbrand
aus
Traunstein
1967

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Privatdozent Dr. H. Mathies
Coreferent:	Professor Dr. W. Seitz
Dekan:	Professor Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 2. 1967

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Problematik	1
Eigene Versuche	5
Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	22
Diskussion	49
Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	51

Problematik

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, um den Wirkungsmechanismus der in vivo hyaluronidasehemmenden Substanzen aufzuklären, da nach Ansicht mancher Autoren die hyaluronidasehemmende Wirkung einen Teileffekt der antirheumatischen Wirkung darstellen soll.

In der Pathogenese des Rheumatismus spielt die gesteigerte Hyaluronidaseaktivität eine große Rolle. Durch die Hyaluronidase werden infolge Depolarisation und Hydrolyse die Hyaluronsäuren, die chemisch Mucopolysaccharide sind und den wesentlichen Teil der Zwischenzellsubstanz ausmachen, abgebaut. Vermehrte Hyaluronidaseaktivität erhöht auch die Permeabilität, wodurch der Sauerstoffaustausch zwischen den Kapillaren und Geweben infolge perikapillären Ödems erschwert wird. Infolge dieser Ernährungsstörung kommt es zur Entleimung der Grundsubstanz, Kollagenschwund, fibrinoider Verquellung, Degeneration und Nekrose (Mathies [1]). Gesteigerte Hyaluronidaseaktivität hat demnach einen vermehrten Abbau von Hyaluronsäure zur Folge und bestimmt damit den Grad der Permeabilität bis zur Steigerung ins Pathologische (Mathies [2], Eppinger [3], Hollmann [4], Epstein [5], Schoen [6]).

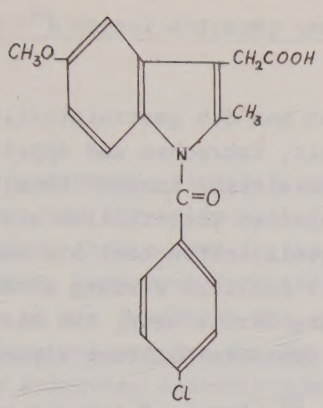
Rheumatikerserum, das nach Eppinger [7] eine permeabilitätssteigernde Wirkung besitzt, hat auch eine erhöhte Hyaluronidaseaktivität zur Folge (Evers [8], Dorfmann [9], Terbrüggen [10], Rimington [11]) und außerdem vielleicht sogar auch eine aktivierende Wirkung auf die Hyaluronidase. Krott [12] zeigte dies in seinem Spreading-Test an weißen Ratten, wobei sich die Farbstoffausbreitung nach Zugabe von Rheumatikerserum im Gegensatz zur Zugabe von Normalserum wesentlich beschleunigte und zwar sowohl ohne Beigabe von Hyaluronidase als auch in noch größerem Ausmaß mit Hyaluronidasezugabe.

Antirheumatisch wirkende Substanzen haben also, wie man glaubt, einen hemmenden Einfluß auf die gesteigerte Hyaluronidaseaktivi-

tät. Allerdings ist dieser Effekt nur ein Teileffekt der Therapie, da sich die antirheumatische Wirkung aus mehreren, zum Teil noch unbekannten Komponenten zusammensetzt. So spielt die antiphlogistische und analgetische Wirkung bei manchen rheumatischen Erkrankungen eine ausschlaggebende Rolle, die allerdings nicht immer dem hyaluronidasehemmenden Effekt parallel geht (D o m e n j o z [13]). So gibt es Substanzen, bei denen eine antirheumatische Wirkung bekannt ist, aber die keinen sofortigen analgetischen Erfolg aufweisen, wie dies bei den Schwefel- und Moorbädern der Fall ist. Eine antirheumatische Wirkung mit analgetischem Effekt ist bei den Salizylaten, Pyrazolol- und Pyrazolonabkömmlingen, ACTH und Glucocorticoiden nachgewiesen worden. Der Wirkungsmechanismus all dieser hyaluronidasehemmenden Substanzen wurden von M a t h i e s [14 - 19] und Mitarbeitern weitgehend aufgeklärt. Sie fanden, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung an eine Aktivierung des Nebennierenmarks gebunden ist und mit einer Ausschüttung der Nebennierenmark-Katecholamine einhergeht. Ebenso lassen die Versuchsergebnisse mit den Nebennierenmark-Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin sowohl bei intakten als auch bei adrenalektomierten Ratten eine hyaluronidasehemmende Wirkung erkennen (M a t h i e s , G l ü c k , P o u l a n t z a s und S c h m i d t [20]).

Im Rahmen der Bemühungen, weitere in der Rheumatherapie angewandter Substanzen einer eingehenden Betrachtung zu unterziehen, wurde in der vorgelegten Arbeit das Antirheumatikum Indometacin auf seine hyaluronidasehemmende Wirkung im Spreading-Test untersucht.

Indometacin, das eine 1-(p-Chlorbenzol)-5-methoxy-2-methylindol-3-essigsäure mit der nachstehenden Strukturformel ist, wurde von S h e n et al. [21] bekanntgegeben.



Seine antiphlogistische Wirkung zeigten W i n t e r [22] und R i s l e y [23] sowohl im Granulombeuteltest mit der Versuchsanordnung subcutan implantierter steriler Wattebäuschchen bei Ratten, in dem die entzündungshemmende Wirkung bei lokaler und oraler Applikation stärker als Hydrocortison und Phenylbutazon bei Berücksichtigung gleicher Dosen war, als auch in der Versuchsanordnung des Rattenpfotenödems bei Ödeminduktion durch Carrageen. Indometacin besitzt außerdem auch eine antipyretische Wirkung, wie dies die Versuche mittels thermoelektrischer Messung der Rektaltemperatur bei Kaninchen und Ratten nach Injektion von Koli-Endotoxin als Pyrogen zeigten (W i n t e r , R i s l e y , N u s s [24]). Auch eine geringe analgetische Wirkung, die etwas wirksamer als die der Azetylsalizylsäure und des Amidopyrins war, ließ sich bei Versuchen an Ratten nachweisen (25).

Von Bedeutung ist, daß sich bei der Behandlung von Rheumatikern mit Indometacin zum größten Teil eine Steroideinsparung erzielen läßt (M a t h i e s [26]). Mit der alleinigen Behandlung durch Indometacin wurden die besten Erfolge bezüglich der Gelenkschmerzen und Gelenkbeweglichkeit erzielt. Morgensteifigkeit und Schwellungen wurden weniger beeinflußt. Außer einigen Nebenerscheinungen, wie Kopfschmerzen, gastrointestinale Erscheinungen und Herzsensationen, wurden schwerere Nebenwirkungen

nach Indometacingabe von M a t h i e s [26] und Mitarbeitern nicht beobachtet.

Zur Diskussion steht, ob man die gastrointestinalen Nebenerscheinungen, wie Übelkeit, Erbrechen und Appetitlosigkeit, nicht als eine allgemeine Indolwirkung ansehen kann, da ja Indometacin infolge seiner chemischen Konstitution als Indolderivat sowohl eine Störung im Eiweißstoffwechsel als auch die einem toxischen Eiweißabbauprodukt ähnliche Wirkung ausüben kann. Ein Hinweis für diese Auffassung dürfte sein, daß diese Nebenwirkungen auch bei Verabreichung dünndarmlöslicher Kapseln auftraten.

Nach S i c u t e r i [27] bzw. S i c u t e r i et al. [28,29] wird dem Indometacin auch ein zerebral vasculärer Effekt mit primärer Vasokonstriktion und reaktiver Dilatation zugesprochen. Diese Wirkung ist der des Ergotamins ähnlich und auf Grund von Messungen des intrakraniellen Druckes, des Karotisdruckes und des Augendruckes teilweise sogar noch stärker.

Eigene Versuche

Versuchsordnung:

Um eine Hyaluronidasehemmung sichtbar und meßbar zu machen, wählten wir die Methode des Spreading-Testes. Bei diesem Verfahren wird mit einer dünnen Kanüle jeweils eine genau bemessene Farbstoff- und eine genau bemessene Farbstoff-Hyaluronidasequaddel streng intracutan in die Bauchhaut des Versuchstieres gesetzt und die Farbstoffausbreitung bei den Quaddeltypen jeweils nach 10 Minuten an der äußersten Ausbreitungskontur markiert, dann auf einen Zelluloidstreifen übertragen und anschließend der Flächeninhalt planimetrisch bestimmt.

Die hyaluronidasehemmende Wirkung der zu untersuchenden Substanz zeigt sich in einer Verringerung der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel gegenüber dem Ausgangswert. Bei den einzelnen beschriebenen Versuchsreihen ist diese Differenz in mm^2 angegeben und diente zur Grundlage der Auswertung und der graphischen Darstellung. Um bei eventuell auftretenden Differenzen einen Einfluß auf die gewebseigene Hyaluronidase oder auf eine hyaluronidaseabhängige permeabilitätshemmende Wirkung des zu den Versuchen herangezogenen Stoffes zu ersehen, wurde gleichzeitig die Beobachtung der Farbstoffausbreitung der reinen Farbstoffquaddel zum Versuch herangezogen.

Nach M a d i n a v e i t i a [30] erfolgt die Ausbreitung der Quaddeln zweiphasig, so daß nur innerhalb der ersten 10 Minuten ein hyaluronidasehemmender Effekt vorliegt, da nach Ablauf der ersten 10 Minuten der Resorptionsmechanismus überwiegt. Der Diffusionseffekt ist nach G i b i a n [31] vom Druck der intracutan gesetzten Quaddeln abhängig. Der Gewebswiderstand wird nach Hyaluronidaseeinwirkung vermindert und nach Gabe einer hyaluronidasehemmenden Substanz wieder erhöht. Bei unseren Versuchen wählten wir weiße männliche Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 279 Gramm. Die Narkose wurde mit Evipan durchgeführt (30 mg Evipan-Natrium/ 100 g Tier s.c.), das nach W i l h e l m i [32] keinen störenden Einfluß auf die Hyaluronidasehemmung ausübt.

Auf die mit Pilca enthaarte Bauchhaut wurde eine Farbstoffquaddel mit 0,1 ml einer 0,06%igen Evansblue-Lösung gesetzt. Zur Herstellung der Hyaluronidaselösung wurde eine Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin) mit 150 IE in 2 ccm der obengenannten Farbstofflösung gelöst. Bei Setzung der Quaddel mit einer Injektion von 0,1 ccm Farbstoff-Hyaluronidaselösung kommen somit 7,5 IE zur Wirkung.

Versuchsreihen:

Vor Beginn des eigentlichen Versuches wurde bei jedem Versuchstier ein Leerversuch mit einer reinen Farbstoff- und einer Farbstoff-Hyaluronidasequaddel durchgeführt. Dann wurde jeweils 1,0 ccm/ 100 g Tier Indometacin (als Suspension in Tyloseschleim) in verschiedenen Konzentrationen intraperitoneal gespritzt. Tyloseschleim hat nach M a t h i e s [33] keinen Einfluß auf die Hyaluronidasehemmung.

Die Quaddelsetzung erfolgt bei jeder Versuchsreihe in jeweils verschiedenen Positionen nach dem Schema des "Lateinischen Quadrates", wobei die Positionen der einzelnen Quaddeln folgendermaßen auf die Bauchhaut der Ratten verteilt wurden:

2	1
4	3
6	5

Tier / Lok.	I	II	III	IV	V	VI
1	FH_{t2}	F_{t1}	F_{t2}	F_V	FH_V	FH_{t1}
2	F_{t1}	F_{t2}	F_V	FH_V	FH_{t1}	FH_{t2}
3	F_{t2}	F_V	FH_V	FH_{t1}	FH_{t2}	F_{t1}
4	F_V	FH_V	FH_{t1}	FH_{t2}	F_{t1}	F_{t2}
5	FH_V	FH_{t1}	FH_{t2}	F_{t1}	F_{t2}	F_V
6	FH_{t1}	FH_{t2}	F_{t1}	F_{t2}	F_V	FH_V

Schema: "Lateinisches Quadrat"

Index V = Vorquaddel
Index t1 bzw. t2 = Quaddel zu festgesetzter Zeit nach Injektion der Untersuchungssubstanz
F = Farbstoff
FH = Farbstoff-Hyaluronidase-Mischung

Da der oben beschriebene Leerversuch allen folgenden Versuchsreihen gemeinsam ist, wird er nur noch stichwörtlich erwähnt.

1. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in einer Konzentration von 100 mg/1 ccm Tyloseschleim pro kg Tiergewicht. Indometacingabe wurde jeweils eine reine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 1 hervor.

2. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der ersten Versuchsreihe. Nach dem gleichen Prinzip wie oben erfolgt nun die Setzung der Quaddelpaare nach 20 und 40 Minuten nach Indometacingabe.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 2 hervor.

3. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der ersten Versuchsreihe. 60 und 80 Minuten nach Indometacingabe wurde nun nach dem oben beschriebenen Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 3 hervor.

4. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der ersten Versuchsreihe. 100 und 120 Minuten nach Indometacingabe wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 4 hervor.

5. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in einer Konzentration von 10 mg/1 ccm Tyloseschleim pro kg Tiergewicht. 5 und 10 Minuten nach Indometacingabe wurden jeweils eine reine Farbstoff- und

eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 5 hervor.

6. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der fünften Versuchsreihe. 20 und 40 Minuten nach Indometacingabe wurde auf oben beschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 6 hervor.

7. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der fünften Versuchsreihe. 60 und 80 Minuten nach Indometacingabe wurde auf oben beschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 7 hervor.

8. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der fünften Versuchsreihe. 100 und 120 Minuten nach Indometacingabe wurde auf oben beschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 8 hervor.

9. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in einer Konzentration von 7,5 mg/1 ccm Tyloseschleim pro kg Tiergewicht. 5 und 10 Minuten nach Indometacingabe wurden jeweils eine reine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 9 hervor.

10. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der neunten Versuchsreihe. 20 und 40 Minuten nach Indometacingabe wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 10 hervor.

11. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der neunten Versuchsreihe. 60 und 80 Minuten nach Indometacingabe wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 11 hervor.

12. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der neunten Versuchsreihe. 100 und 120 Minuten nach Indometacingabe wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 12 hervor.

13. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in einer Konzentration von 5,0 mg/1 ccm Tyloseschleim pro kg Tiergewicht. 20 und 40 Minuten nach Indometacingabe wurden jeweils eine reine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 13 hervor.

14. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der 13. Versuchsreihe. 60 und 80 Minuten nach Indometacingabe wurde auf oben beschriebene Art die Hyaluronidasehem-

mung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 14 hervor.

15. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der 13. Versuchsreihe. 100 und 120 Minuten nach Indometacingabe wurde auf oben beschriebene Art die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 15 hervor.

16. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in einer Konzentration von 1,0 mg/1 ccm Tyloseschleim pro kg Tiergewicht. 20 und 40 Minuten nach Indometacingabe wurden jeweils eine reine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 16 hervor.

17. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der 16. Versuchsreihe. 60 und 80 Minuten nach Indometacingabe wurde nach oben beschriebenem Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 17 hervor.

18. Versuchsreihe:

Leerversuch; Indometacinapplikation in derselben Konzentration wie in der 16. Versuchsreihe. 100 und 120 Minuten nach Indometacingabe wurde nach oben beschriebenem Prinzip die Hyaluronidasehemmung bestimmt.

Die Einzelergebnisse gehen aus Tabelle 18 hervor.

- Tabelle 1 -

Indometacin Dosis: 100 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_5	F_{10}	FH_V	FH_5	FH_{10}
I	325 g	110	110	110	212	210	188
II	335 g	125	110	120	223	225	210
III	315 g	151	135	149	217	211	218
IV	375 g	132	130	136	230	203	199
V	370 g	133	140	125	220	198	170
VI	330 g	125	130	135	214	212	203
Summe	2050 g	776	755	775	1316	1259	1188
Mittel-wert	342 g	129	126	129	219	210	198
Differenz			- 3	± 0		- 9	- 21

- Tabelle 2 -

Indometacin Dosis: 100 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{20}	F_{40}	FH_V	FH_{20}	FH_{40}
I	340 g	120	130	128	250	225	220
II	380 g	142	140	134	235	211	210
III	370 g	131	129	130	217	179	175
IV	310 g	124	131	122	200	227	205
V	295 g	125	120	125	220	200	190
VI	300 g	135	125	122	215	195	189
Summe	1995 g	777	775	761	1337	1237	1189
Mittel-wert	333 g	130	129	127	223	206	198
Differenz			- 1	- 3		- 17	- 25

- Tabelle 3 -

Indometacin Dosis: 100 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{60}	F_{80}	FH_V	FH_{60}	FH_{80}
I	205 g	158	162	165	260	259	192
II	160 g	140	138	130	220	138	195
III	240 g	135	139	120	240	200	203
IV	290 g	128	123	126	228	185	185
V	235 g	126	120	122	212	170	172
VI	265 g	138	135	135	248	198	205
Summe	1395 g	825	817	798	1408	1150	1152
Mittel-wert	233 g	137	136	133	235	192	192
Differenz			- 1	- 4		- 43	- 43

- Tabelle 4 -

Indometacin Dosis: 100 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{100}	F_{120}	FH_V	FH_{100}	FH_{120}
I	150 g	138	138	130	231	180	175
II	170 g	130	125	128	268	240	235
III	170 g	122	122	115	230	179	170
IV	170 g	132	128	127	240	182	180
V	170 g	145	130	135	204	190	170
VI	200 g	140	138	125	220	190	180
Summe	1030 g	807	781	760	1393	1161	1110
Mittel-wert	172 g	135	130	127	232	194	185
Differenz			- 5	- 8		- 38	- 47

- Tabelle 5 -

Indometacin Dosis: 10 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_5	F_{10}	FH_V	FH_5	FH_{10}
I	420 g	110	115	105	256	251	251
II	380 g	110	113	142	226	210	210
III	390 g	122	116	100	230	211	215
IV	350 g	112	116	113	229	214	184
V	280 g	118	115	115	201	190	200
VI	290 g	120	118	112	216	200	200
Summe	2110 g	692	693	687	1357	1276	1260
Mittel-wert	352 g	115	116	115	226	213	210
Differenz			+ 1	± 0		- 13	- 16

- Tabelle 6 -

Indometacin Dosis: 10 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{20}	F_{40}	FH_V	FH_{20}	FH_{40}
I	265 g	125	118	122	220	195	198
II	405 g	130	135	135	215	180	178
III	395 g	118	119	106	228	210	188
IV	275 g	125	122	114	188	176	164
V	325 g	112	116	120	180	180	169
VI	340 g	119	115	112	210	174	203
Summe	2005 g	729	725	709	1231	1115	1100
Mittel-wert	334 g	122	121	118	205	186	183
Differenz			- 1	- 4		- 19	- 22

- Tabelle 7 -

Indometacin Dosis: 10 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{60}	F_{80}	FH_V	FH_{60}	FH_{80}
I	270 g	130	132	130	238	220	202
II	290 g	128	122	120	232	210	203
III	270 g	118	120	118	218	198	188
IV	340 g	108	110	110	202	175	176
V	330 g	130	122	120	215	170	185
VI	320 g	128	120	115	220	188	196
Summe	1820 g	742	726	713	1325	1161	1150
Mittel-wert	303 g	124	121	119	221	194	191
Differenz			- 3	- 5		- 27	- 30

- Tabelle 8 -

Indometacin Dosis: 10 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{100}	F_{120}	FH_V	FH_{100}	FH_{120}
I	370 g	118	100	120	205	160	165
II	350 g	110	120	120	225	190	180
III	380 g	135	130	120	258	200	190
IV	340 g	135	120	120	235	185	185
V	340 g	123	111	113	240	180	190
VI	350 g	120	120	118	230	200	185
Summe	2130 g	741	701	711	1393	1115	1095
Mittel-wert	355 g	124	117	119	232	186	183
Differenz			- 7	- 5		- 46	- 49

- Tabelle 9 -

Indometacin Dosis: 7,5 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_5	F_{10}	FH_V	FH_5	FH_{10}
I	270 g	129	115	119	234	240	208
II	270 g	140	140	140	222	232	238
III	270 g	120	125	129	210	212	220
IV	290 g	129	115	120	200	203	200
V	260 g	122	126	126	230	215	214
VI	310 g	115	122	112	232	212	210
Summe	1670 g	755	743	746	1328	1314	1290
Mittel-wert	275 g	126	124	124	221	219	215
Differenz			- 2	- 2		- 2	- 6

- Tabelle 10 -

Indometacin Dosis: 7,5 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{20}	F_{40}	FH_V	FH_{20}	FH_{40}
I	260 g	140	138	135	225	223	200
II	290 g	126	123	110	210	208	190
III	350 g	125	120	123	235	202	215
IV	300 g	126	123	118	235	195	200
V	350 g	132	128	110	235	210	200
VI	360 g	115	112	109	212	228	200
Summe	1910 g	764	744	705	1352	1266	1205
Mittel-wert	318 g	127	123	118	225	211	201
Differenz			- 4	- 9		- 14	- 24

- Tabelle 11 -

Indometacin Dosis: 7,5 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{60}	F_{80}	FH_V	FH_{60}	FH_{80}
I	220 g	118	130	123	245	240	221
II	210 g	122	115	116	220	222	190
III	300 g	122	130	120	255	208	201
IV	260 g	149	140	145	267	210	230
V	160 g	145	134	140	265	241	238
VI	250 g	112	120	109	249	212	210
Summe	1400 g	768	769	753	1501	1333	1290
Mittel-wert	233 g	128	128	126	250	222	215
Differenz			± 0	- 2		- 28	- 35

- Tabelle 12 -

Indometacin Dosis: 7,5 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{100}	F_{120}	FH_V	FH_{100}	FH_{120}
I	220 g	130	120	128	248	170	189
II	180 g	124	122	119	220	210	209
III	220 g	115	110	110	235	198	200
IV	190 g	128	118	120	190	192	165
V	280 g	110	112	105	209	179	168
VI	240 g	125	122	120	192	192	180
Summe	1330 g	732	704	702	1294	1141	1111
Mittel-wert	222 g	122	117	117	216	190	185
Differenz			- 5	- 5		- 26	- 31

- Tabelle 13 -

Indometacin Dosis: 5,0 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{20}	F_{40}	FH_V	FH_{20}	FH_{40}
I	300 g	118	125	115	230	224	235
II	300 g	130	120	150	253	244	251
III	225 g	136	130	135	240	240	233
IV	260 g	150	156	123	240	238	234
V	230 g	135	129	120	240	221	238
VI	230 g	132	138	136	245	245	238
Summe	1545 g	801	798	779	1448	1412	1429
Mittel-wert	258 g	134	133	130	241	235	238
Differenz			- 1	- 4		- 6	- 3

- Tabelle 14 -

Indometacin Dosis: 5,0 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{60}	F_{80}	FH_V	FH_{60}	FH_{80}
I	220 g	126	118	123	255	225	237
II	230 g	128	123	128	245	245	236
III	250 g	131	120	135	231	230	232
IV	230 g	120	128	125	235	239	235
V	240 g	150	140	120	225	226	229
VI	250 g	133	130	120	214	218	215
Summe	1420 g	788	759	751	1405	1383	1384
Mittel-wert	237 g	131	127	125	234	231	231
Differenz			- 4	- 6		- 3	- 3

- Tabelle 15 -

Indometacin Dosis: 5,0 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{100}	F_{120}	FH_V	FH_{100}	FH_{120}
I	240 g	125	114	122	201	200	215
II	230 g	132	120	122	225	225	215
III	190 g	129	135	131	205	200	204
IV	190 g	135	130	125	190	212	205
V	210 g	130	122	130	210	222	210
VI	180 g	138	130	125	218	218	210
Summe	1240 g	789	751	755	1249	1277	1259
Mittel-wert	207 g	132	125	126	208	213	210
Differenz			- 7	- 6		+ 5	+ 2

- Tabelle 16 -

Indometacin Dosis: 1,0 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{20}	F_{40}	FH_V	FH_{20}	FH_{40}
I	260 g	140	150	160	210	235	213
II	370 g	115	100	102	210	215	218
III	270 g	128	128	138	239	240	215
IV	335 g	112	110	116	238	232	230
V	350 g	105	108	105	212	210	210
VI	340 g	100	90	98	223	216	211
Summe	1925 g	700	678	719	1332	1348	1297
Mittel-wert	321 g	117	113	120	222	225	216
Differenz			- 4	+ 3		+ 3	- 6

- Tabelle 17 -

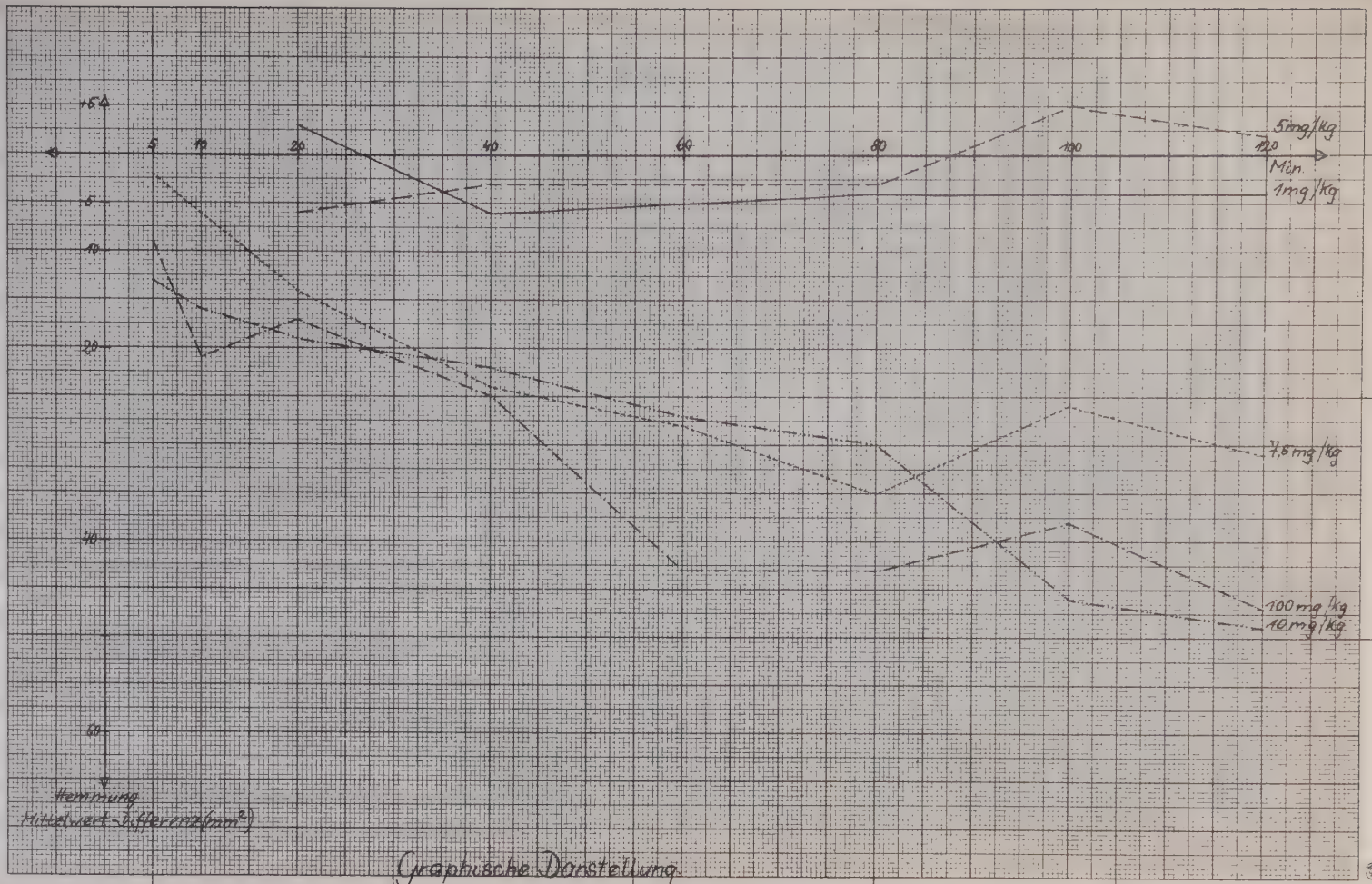
Indometacin Dosis: 1,0 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{60}	F_{80}	FH_V	FH_{60}	FH_{80}
I	240 g	140	123	125	226	211	225
II	260 g	140	118	140	227	218	217
III	210 g	148	140	123	268	261	260
IV	360 g	120	125	132	231	234	224
V	240 g	120	118	126	224	232	221
VI	240 g	128	132	129	244	234	230
Summe	1550 g	796	756	775	1420	1390	1377
Mittel-wert	258 g	133	126	129	237	232	229
Differenz			- 7	- 4		- 5	- 8

- Tabelle 18 -

Indometacin Dosis: 1,0 mg/ kg Tier

Tier	Gewicht	F_V	F_{100}	F_{120}	FH_V	FH_{100}	FH_{120}
I	270 g	132	128	118	235	228	235
II	240 g	130	125	120	229	224	212
III	210 g	128	120	129	212	205	213
IV	280 g	122	123	130	232	222	230
V	200 g	142	140	122	222	225	220
VI	250 g	128	135	120	212	218	210
Summe	1450 g	782	771	739	1342	1322	1320
Mittel-wert	242 g	130	129	123	224	220	220
Differenz			- 1	- 7		- 4	- 4



Graphische Darstellung

Statistische Bewertung der Prüfungsergebnisse

1. Beschreibende Statistik

Um die Heterogenität zwischen den Versuchstieren hinsichtlich ihrer Ausgangswerte auszuschalten, wurde für die statistische Bewertung der Prüfungsergebnisse für jedes Versuchstier die individuelle Abweichung nach Applikation eines Verfahrens gegenüber dem zugehörigen Ausgangswert herangezogen (Abweichungen vom Ausgangswert).

In einigen Versuchsanordnungen liegen zwischen den verschiedenen Versuchsreihen statistisch faßbare Unterschiede hinsichtlich der Ausgangslagen vor. Inwieweit hierdurch eine Verzerrung des Prüfungsergebnisses bewirkt wird, konnte auf der Grundlage der kleinen Stichproben nicht beurteilt werden; es muß jedoch zumindest vermutet werden, daß hierdurch die Heterogenität in der Reaktion der Versuchstiere vergrößert worden ist.

In den Versuchsanordnungen Abb. I - V haben wir für jede Versuchsanordnung die beobachteten mittleren Abweichungen gegenüber dem Ausgangswert für die reine Farbstoff-Quaddel und für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel dargestellt. Außerdem wurde für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel die quadratische Regression eingezeichnet, die wir ab der Beobachtungszeit 20' in jeder Versuchsanordnung berechnet haben. Mit diesen quadratischen Regressionen sollten deskriptiv zwei Fragen geklärt werden:

1. Zunächst sollte durch die quadratischen Regressionen dargestellt werden, inwieweit zwischen den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten ein systematischer Verlauf der Abweichungen der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vorliegt. Die statistische Überprüfung dieses Sachverhaltes ergibt, daß dies für alle Versuchsanordnungen zutrifft. Abgesehen von dieser Ausnahme zeigt sich somit in allen Versuchsanordnungen ein systematischer Trend im Verhalten der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel, zumindest ab dem Zeitpunkt 20'.

2. Mit Hilfe der quadratischen Regressionen sollte als einfacher Parameter zur Charakterisierung des gesamten Versuchsablaufes das sog. "Wirkungs-Integral J" für jede einzelne Versuchsanordnung berechnet werden. Dieses Wirkungs-Integral ist als die Fläche zwischen der quadratischen Regression und der Null-Linie definiert. Wir haben sie in jeder Versuchsanordnung für die Zeitabschnitte zwischen 20' und 80' einerseits und zwischen 20' und 120' andererseits berechnet. Diese zweifache Berechnung war erforderlich, da in den einzelnen Versuchsanordnungen die Beobachtungszeiten nicht vollständig übereinstimmten. Prinzipiell vernachläßigt wurden bei der Berechnung der Wirkungs-Integrale die Zeitpunkte 5' und 10' soweit sie in den Versuchsanordnungen beobachtet worden sind.

In den Tabellen 20, 23, 26, 29 und 32 haben wir das Verhalten der Farbstoff-Quaddel dargestellt. Für jeden Zeitpunkt ist hier das arithmetische Mittel der beobachteten Abweichungen sowie der zugehörige simultane 95%-Konfidenzbereich angegeben. Innerhalb einer Versuchsanordnung kann für alle arithmetischen Mittel, deren Konfidenzbereich den Wert Null nicht enthält, behauptet werden, daß es sich hierbei um eine statistisch gesicherte Veränderung des Spreadings der reinen Farbstoff-Quaddel zu dem betreffenden Zeitpunkt handelt. Die Gesamtaussage für eine Versuchsanordnung ist dabei mit einer maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % behaftet. Berücksichtigt man die Größe dieser Konfidenzbereiche, so ergibt sich, daß in keiner der Versuchsanordnungen eine statistisch faßbare, systematische Veränderung der reinen Farbstoff-Quaddel vorliegt. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist jedoch zu bedenken, daß die Variabilität in der Reaktion der Tiere teilweise sehr hoch ist, was sich in der Größe der Konfidenzbereiche manifestiert.

In den Tabellen 21, 24, 27, 30 und 33 wurde das Ergebnis der statistischen Bewertung des Verhaltens der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel dargestellt. Auch hier wurde für jeden Beobachtungszeitpunkt die mittlere Abweichung und der zugehörige simultane

95%-Konfidenzbereich angegeben. Die Interpretation dieser statistischen Parameter entspricht derjenigen, die bereits oben für das Verhalten der reinen Farbstoff-Quaddel erläutert wurde. Aus der Größe dieser Konfidenzbereiche ergibt sich, daß eine statistisch faßbare Hemmung des Spreadings der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel nur in den Versuchsanordnungen Tabelle 25 - 33 vorliegt. In den restlichen Versuchsanordnungen können die beobachteten Abweichungen im Spreading der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel noch durchaus zufallbedingt sein.

Eine statistisch faßbare Abhängigkeit der Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings von der Beobachtungszeit liegt nur in den Versuchsanordnungen Tabelle 28 - 33. In allen anderen Versuchsanordnungen kann auf Grund der statistischen Tests angenommen werden, daß die Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings nicht wesentlich vom Zeitpunkt der Beobachtung abhängt. Auch hier gilt allerdings die bereits oben zum Verhalten der reinen Farbstoff-Quaddel gemachte Bemerkung, daß die Trennschärfe dieser statistischen Aussage wegen der starken Heterogenität in der Reaktion der Tiere sehr beschränkt ist.

In den mit Indometacin durchgeführten Versuchsanordnungen zeigt sich insofern eine Dosis-Relation, als bis zur Dosierung 5 mg/kg keine wesentliche Hemmung auftritt, während in den drei höheren Dosierungen eine statistisch faßbare Hemmung im Spreading der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vorliegt. Aus der Größe der Wirkungs-Integrale ergibt sich dabei außerdem, daß diese Hemmung dosisabhängig zunimmt.

2. Prüfende Statistik

Prüfung der Ausgangslagen

1. Prüffrage:	Innerhalb der gleichen Versuchsanordnung liegen zwischen den Versuchsreihen keine Unterschiede in den Verteilungen der Ausgangswerte vor.
Test-Verfahren:	BARTLETT-Test und einfache Varianz-Analyse.

Test-Ergebnisse: s. die Zusammenstellungen in den jeweiligen Tabellen 1

Formale Konsequenz: Hinsichtlich der Varianzen liegen in keiner der Versuchsanordnungen Unterschiede zwischen den zugehörigen Versuchsreihen vor. Für die FH-Quaddel liegen hinsichtlich der arithmetischen Mittel in den Versuchsanordnungen Tabelle 22 - 27 statistisch relevante Unterschiede zwischen den zugehörigen Versuchsreihen vor. Für welche Versuchsreihen speziell diese Unterschiede zutreffen, ergibt sich aus den arithmetischen Mitteln und den zugehörigen minimalen Mittelwertdifferenzen.

Im Hinblick auf die kleinen Stichproben-Umfänge je Versuchsreihe ist es nicht möglich, mit statistischen Mitteln zu beurteilen, inwieweit Unterschiede in den Ausgangslagen das Versuchsergebnis beeinflussen bzw. verfälschen.

Verhalten der Farbstoff-Quaddel während des Versuches

2. Prüffrage: Innerhalb der gleichen Versuchsanordnung liegen zwischen den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten keine Verteilungsunterschiede für die Abweichungen der F-Quaddel von ihrem jeweiligen Ausgangswert vor.

Test-Verfahren: BARTLETT-Test und einfache Varianz-Analyse

Test-Ergebnisse: s. die Zusammenstellungen in den jeweiligen Tabellen 2

Formale Konsequenz: Hinsichtlich der Varianzen liegen in den Versuchsanordnungen Tabelle 25 - 30 Unterschiede zwischen den Beobachtungszeitpunkten vor. In den Versuchsanordnungen Tabelle 25 - 27 sind sie durch extrem kleine Varianzen zu den Zeitpunkten 20' und 120' bedingt; in den Versuchsanordnungen Tabelle 28 - 30 durch eine extrem große Varianz

zum Zeitpunkt 10'. In keiner der beiden Versuchsanordnungen zeigt sich eine systematische Abhängigkeit der Varianzen vom Beobachtungszeitpunkt; es kann wohl angenommen werden, daß es sich bei den beobachteten "Ausreißern" um zufällige Effekte handelt. Sie wurden daher weiterhin nur in diesem Sinne berücksichtigt.

Hinsichtlich der arithmetischen Mittel zeigen sich in keiner Versuchsanordnung Unterschiede zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. Sie können demnach während der gesamten Versuchsdauer als praktisch konstant angesehen werden. Die Größe der simultanen 95%-Konfidenzbereiche zeigt außerdem, daß in keiner Versuchsanordnung eine wesentliche Abweichung der F-Quaddel vom Ausgangswert vorliegt. Insgesamt läßt sich somit kein statistisch faßbarer systematischer Einfluß einer Versuchsanordnung auf das Verhalten der F-Quaddel feststellen.

Verhalten der Farbstoff-Hyaluronidase—Quaddel während des Versuches

3. Prüffrage: Innerhalb der gleichen Versuchsanordnung liegen zwischen den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten keine Verteilungsunterschiede für die Abweichungen der FH-Quaddel von ihrem jeweiligen Ausgangswert vor.

Test-Verfahren: BARTLETT-Test und kombinierte Varianz- und Regressions-Analyse.

Test-Ergebnis: s. die Zusammenstellung in den jeweiligen Tabellen 3.

Formale Konsequenz: Hinsichtlich der Varianzen liegen in keiner der Versuchsanordnungen zwischen den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten stati-

stisch faßbare Unterschiede vor.
Hinsichtlich der arithmetischen Mittel ergeben sich nur in den Versuchsanordnungen Tabelle 25 - 33 statistisch faßbare Unterschiede zwischen den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten; in allen anderen Versuchsanordnungen können die Abweichungen der FH-Quaddel als praktisch konstant angesehen werden. Bei dieser Aussage ist allerdings die teilweise extrem hohe Variabilität in der Reaktion der Tiere zu berücksichtigen (s. die Konfidenzbereiche), welche die Trennschärfe der statistischen Tests stark reduziert.
Unter Berücksichtigung der simultanen Konfidenzbereiche ergibt sich, daß in den Versuchsanordnungen Tabelle 19 - 24 die beobachteten Abweichungen der FH-Quaddel noch zufällig bedingt sein können, statistisch läßt sich diese Möglichkeit jedenfalls nicht ausschließen. In allen anderen Versuchsanordnungen d. h. in den Anordnungen Tabelle 25 - 33 liegen statistisch faßbare Hemmungen des Hyaluronidase-Spreadings vor.

Die in der Regressions-Analyse durchgeführte Anpassung einer quadratischen Regression der Abweichungen nach der Beobachtungszeit ist für alle Versuchsanordnungen zulässig (s. Varianz-Komponente "Restabweichung"). Die Berücksichtigung der zeitlichen Reihenfolge der Beobachtungen in der Regressions-Analyse führt jedoch zu keinen wesentlich anderen Ergebnissen als die gewöhnliche Varianz-Analyse.

Zu den Wirkungs-Integralen sei noch bemerkt, daß sie naturgemäß nur als grobe Näherungen anzusehen sind, was bereits in der Größe

ihrer 95%-Konfidenzbereiche zum Ausdruck kommt. Sie sind primär als zusammenfassende, beschreibende Parameter gedacht; formal statistisch kommt ihnen praktisch keine Bedeutung zu.

Zusätzliche Erläuterungen zu den Tabellen

Tabellen: 19, 22, 25, 28, 31	Zusätzlich zu den arithmetischen Mitteln ist die kleinste, statistisch wesentliche Differenz zwischen zwei arithmetischen Mitteln angegeben (nach TUKEY); wobei ein Test-Niveau von 5 % festgesetzt wurde. Es handelt sich hier also nicht um die Konfidenzbereiche.
Tabellen: 20, 23, 26, 29, 32 21, 24, 27, 30, 33	Zusätzlich zu den arithmetischen Mitteln ist ihr simultaner 95 %-Konfidenzbereich angegeben. Behauptet man für alle arithmetischen Mittel, deren Konfidenzbereich den Wert Null nicht umfaßt, daß sie real von Null verschieden sind, so ist diese Gesamtaussage mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5 % behaftet.

- Tabelle 19 -

Vergleich der Ausgangslagen
Indometacin 1,0 mg/kg

1. Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	2	896,44	448,22	3,33
Innerhalb Versuchsreihen	15	2.016,00	134,40	
Gesamt-Varianz	17	2.912,44	171,32	

BARTLETT-Test: n = 2, x^2 = 3,581
$s_{\bar{x}}$ = 4,7329; s_g = 2,7325

2. Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchreihen	2	773,78	386,89	2,02
Innerhalb Versuchsreihen	15	2.870,66	191,38	
Gesamt-Varianz	17	3.644,44	214,38	

BARTLETT-Test: n = 2, x^2 = 1,590
$s_{\bar{x}}$ = 5,6477; s_g = 3,6740

3. Arithmetische Mittel

V-Reihe	$\bar{x}$ (F)	$\bar{x}$ (FH)
20'/40'	116,7 ± 17,4	222,0 ± 20,7
60'/80'	132,7 ± 17,4	236,7 ± 20,7
100'/120'	130,3 ± 17,4	223,7 ± 20,7
Gesamt	126,6 ± 5,8	227,4 ± 7,8

- Tabelle 20 -

Farbstoff-Quaddel

Abweichungen von den Ausgangswerten

Indometacin 1,0 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Zeiten	5	425,22	85,04	-
Innerhalb Zeiten	30	3.262,65	108,76	
Gesamt-Varianz	35	3.687,89	105,37	

$s_{\bar{x}} = 4,2574$

BARTLETT-Test: n = 5; $x^2 = 5,251$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (F)
20'	- 2,33 ± 11,58
40'	3,17 ± 11,58
60'	- 6,67 ± 11,58
80'	- 3,50 ± 11,58
100'	- 1,83 ± 11,58

- Tabelle 21 -

Farbstoff-Hyase-Quaddel

Abweichungen vom Ausgangswert

Indometacin 1,0 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Quadratische Regression	2	258,82	129,41	1,71
Rest-Abweichung	3	94,74	31,58	-
Innerhalb Zeiten	30	2.265,65	75,52	
Gesamt-Varianz	35	2.619,21	74,83	

$e_{\bar{x}} = 3,5478$

BARTLETT-Test: $n = 5$; $x^2 = 7,323$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (FH)
20'	2,67 ± 9,65
40'	- 5,83 ± 9,65
60'	- 5,00 ± 9,65
80'	- 7,17 ± 9,65
100'	- 3,33 ± 9,65
120'	- 3,67 ± 9,65

Wirkungs-Integrale

J (20' - 120') = - 22,54 ± 15,59
J (20' - 80') = - 12,21 ± 11,09

- Tabelle 22 -

Vergleich der Ausgangslagen
Indometacin 5,0 mg/kg

1. Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	2	17,44	8,72	-
Innerhalb Versuchsreihen	15	1.160,33	77,36	
Gesamt-Varianz	17	1.177,77	69,28	

BARTLETT-Test: $n = 2$; $x^2 = 4,075$

$s_{\bar{x}} = 3,5906$ $s_g = 2,0730$

2. Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	2	3.654,78	1.827,39	12,99
Innerhalb Versuchsreihen	15	2.110,99	140,73	
Gesamt-Varianz	17	5.765,77	339,16	

BARTLETT-Test: $n = 2$; $x^2 = 2,463$

$s_{\bar{x}} = 4,8431$ $s_g = 2,7962$

3. Arithmetische Mittel

V-Reihe	$\bar{x}$ (F)	$\bar{x}$ (FH)
20'/40'	133,5 ± 13,2	241,3 ± 17,8
60'/80'	131,3 ± 13,2	234,2 ± 17,8
100'/120'	131,5 ± 13,2	208,2 ± 17,8
Gesamt	132,1 ± 4,4	227,9 ± 5,9

- Tabelle 23 -

Farbstoff-Quaddel

Abweichungen von den Ausgangswerten
Indometacin 5,0 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Zeiten	5	145,81	29,16	-
Innerhalb Zeiten	30	3.127,15	104,24	
Gesamt-Varianz	35	3.272,97	93,51	

$s_{\bar{x}} = 4,1681$

BARTLETT-Test: $n = 5$; $x^2 = 10,807$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (F)
20'	- 0,50 ± 11,34
40'	- 3,67 ± 11,34
60'	- 4,83 ± 11,34
80'	- 6,17 ± 11,34
100'	- 6,33 ± 11,34
120'	- 5,67 ± 11,34

- Tabelle 24 -

Farbstoff-Hyase-Quaddel

Abweichungen vom Ausgangswert

Indometacin 5,0 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Quadratische Regression	2	331,65	165,82	1,86
Rest-Abweichung	3	146,02	48,67	
Innerhalb Zeiten	30	2.668,32	88,94	
Gesamt-Varianz	35	3.146,00	89,89	

$s_{\bar{x}} = 3,8502$

BARTLETT-Test: $n = 5$; $x^2 = 6,720$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (FH)
20'	- 6,00 ± 10,47
40'	- 3,17 ± 10,47
60'	- 3,67 ± 10,47
80'	- 3,50 ± 10,47
100'	4,67 ± 10,47
120'	1,67 ± 10,47

Wirkungs-Integrale

J (20' - 120') = - 8,74 ± 16,92

J (20' - 80') = - 10,66 ± 12,02

- Tabelle 25 -

Vergleich der Ausgangslagen
Indometacin 7,5 mg/kg

1. Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	3	126,83	42,28	-
Innerhalb Versuchsreihen	20	2.197,66	109,88	
Gesamt-Varianz	23	2.324,49	101,06	

BARTLETT-Test: $n = 3$; $x^2 = 3,903$

$s_{\bar{x}} = 4,2795$ $s_g = 2,1397$

2. Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	3	4.169,79	1.389,93	4,80
Innerhalb Versuchsreihen	20	5.792,82	289,64	
Gesamt-Varianz	23	9.962,61	433,16	

BARTLETT-Test: $n = 3$; $x^2 = 3,246$

$s_{\bar{x}} = 6,9479$ $s_g = 3,4740$

3. Arithmetische Mittel

V-Reihe	$\bar{x}$ (F)	$\bar{x}$ (FH)
5'/10'	125,8 ± 16,9	221,3 ± 27,5
20'/40'	127,2 ± 16,9	225,3 ± 27,5
60'/80'	128,0 ± 16,9	250,2 ± 27,5
100'/120'	122,0 ± 16,9	215,7 ± 27,5
Gesamt	125,8 ± 4,4	228,1 ± 7,2

- Tabelle 26 -

Farbstoff-Quaddel

Abweichungen von den Ausgangswerten

Indometacin 7,5 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Zeiten	7	374,58	53,51	1,23
Innerhalb Zeiten	40	1.745,32	43,63	
Gesamt-Varianz	47	2.119,92	45,10	

$s_{\bar{x}}$ = 2,3354

BARTLETT-Test: n / 7; x^2 = 27,849

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (F)
5'	- 2,00 ± 6,47
10'	- 1,50 ± 6,47
20'	- 3,17 ± 6,47
40'	- 9,67 ± 6,47
60'	0,17 ± 6,47
80'	- 2,50 ± 6,47
100'	- 4,67 ± 6,47
120'	- 5,00 ± 6,47

- Tabelle 27 -

Farbstoff-Hyase-Quaddel

Abweichungen vom Ausgangswert

Indometacin 7,5 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen 5' und 10'	1	48,00	48,00	-
Zwischen Zeitabschnitten	1	4.356,00	4.356,00	11,93
Quadr. Regression 20'-120'	2	1.149,96	574,98	1,57
Rest-Abweichung		327,37	109,12	-
Innerhalb Zeiten	40	14.605,32	365,13	
Gesamt-Varianz	47	20.486,65	435,89	

$s_{\bar{x}} = 6,7559$

BARTLETT-Test: $n = 7$; $x^2 = 13,129$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (FH)
5'	- 2,33 ± 18,71
10'	- 6,33 ± 18,71
20'	- 14,33 ± 18,71
40'	- 24,50 ± 18,71
60'	- 28,00 ± 18,71
80'	- 35,17 ± 18,71
100'	- 25,50 ± 18,71
120'	- 30,50 ± 18,71

Wirkungs-Integrale

J (20' - 120') = - 137,51 ± 34,00

J (20' - 80') = - 76,11 ± 24,13

- Tabelle 28 -

Vergleich der Ausgangslagen
Indometacin 10 mg/kg

1. Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	3	274,33	91,44	1,48
Innerhalb Versuchsreihen	20	1.231,66	61,58	
Gesamt-Varianz	23	1.505,99	65,48	

BARTLETT-Test: $n = 3$; $x^2 = 2,818$

$s_{\bar{x}} = 3,2037$ $s_g = 1,6019$

2. Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	3	2.116,13	705,38	2,45
Innerhalb Versuchsreihen	20	5.769,82	288,49	
Gesamt-Varianz	23	7.885,95	342,87	

BARTLETT-Test: $n = 3$; $x^2 = 1,014$

$s_{\bar{x}} = 6,9341$ $s_g = 3,4671$

3. Arithmetische Mittel

V-Reihe	$\bar{x}$ (F)	$\bar{x}$ (FH)
5'/10'	115,3 ± 12,7	226,3 ± 27,5
20'/40'	121,5 ± 12,7	206,8 ± 27,5
60'/80'	123,7 ± 12,7	220,8 ± 27,5
100'/120'	123,5 ± 12,7	232,2 ± 27,5
Gesamt	121,0 ± 3,3	221,5 ± 7,2

- Tabelle 29 -

Farbstoff-Quaddel

Abweichungen von den Ausgangswerten
Indometacin 10 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Zeiten	7	247,15	35,31	
Innerhalb Zeiten	40	3.549,81	88,75	
Gesamt-Varianz	47	3.796,98	82,91	

$s_{\bar{x}} = 3,3306$

BARTLETT-Test: $n = 7$; $x^2 = \underline{17,460}$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (F)
5'	0,17 ± 9,23
10'	- 0,83 ± 9,23
20'	- 0,67 ± 9,23
40'	- 3,33 ± 9,23
60'	- 2,67 ± 9,23
80'	- 4,83 ± 9,23
100'	- 6,67 ± 9,23
120'	- 5,00 ± 9,23

- Tabelle 30 -

Farbstoff-Hyase-Quaddel

Abweichungen vom Ausgangswert

Indometacin 10 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen 5' und 10'	1	21,33	21,33	-
Zwischen Zeitabschnitten	1	2.862,25	2.862,25	23,09
Quadr. Regression 20'-120'	2	4.149,31	2.074,66	16,74
Rest-Abweichung	3	269,36	89,79	-
Innerhalb Zeiten	40	4.958,98	123,97	
Gesamt-Varianz	47	12.261,23	260,88	

$s_{\bar{x}} = 3,9366$

BARTLETT-Test: $n = 7$; $x^2 = 12,269$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (FH)
5'	- 13,67 ± 10,90
10'	- 16,33 ± 10,90
20'	- 21,00 ± 10,90
40'	- 23,50 ± 10,90
60'	- 27,33 ± 10,90
80'	- 29,17 ± 10,90
100'	- 46,33 ± 10,90
120'	- 49,67 ± 10,90

Wirkungs-Integrale

J (20' - 120') = - 159,89 ± 19,77

J (20' - 80') = - 76,59 ± 14,06

- Tabelle 31 -

Vergleich der Ausgangslagen
Indometacin 100 mg/kg

1. Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	3	287,12	95,71	-
Innerhalb Versuchsreihen	20	2.221,83	111,09	
Gesamt-Varianz	23	2.508,95	109,08	

BARTLETT-Test: $n = 3$; $x^2 = 2,261$

$s_{\bar{x}} = 4,3029$ $s_g = 2,1515$

2. Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Versuchsreihen	3	968,17	322,72	1,14
Innerhalb Versuchsreihen	20	5.640,32	282,02	
Gesamt-Varianz	23	6.608,49	287,33	

BARTLETT-Test: $n = 3$; $x^2 = 7,106$

$s_{\bar{x}} = 6,8558$ $s_g = 3,4279$

3. Arithmetische Mittel

V-Reihe	$\bar{x}$ (F)	$\bar{x}$ (FH)
5'/10'	129,3 ± 17,0	219,3 ± 27,1
20'/40'	129,5 ± 17,0	222,8 ± 27,1
60'/80'	137,5 ± 17,0	234,7 ± 27,1
100'/120'	134,5 ± 17,0	232,2 ± 27,1
Gesamt	132,7 ± 4,5	227,2 ± 7,1

- Tabelle 32 -

Farbstoff-Quaddel

Abweichungen von den Ausgangswerten

Indometacin 100 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen Zeiten	7	273,67	39,10	-
Innerhalb Zeiten	40	1.867,98	46,70	
Gesamt-Varianz	47	2.141,67	45,57	

$s_{\bar{x}} = 2,4161$

BARTLETT-Test: $n = 7$; $x^2 = 6,316$

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (F)
5'	- 3,50 ± 6,69
10'	- 0,17 ± 6,69
20'	- 0,33 ± 6,69
40'	- 2,67 ± 6,69
60'	- 1,33 ± 6,69
80'	- 4,50 ± 6,69
100'	- 4,33 ± 6,69
120'	- 7,83 ± 6,69

- Tabelle 33 -

Farbstoff-Hyase-Quaddel

Abweichungen vom Ausgangswert
Indometacin 100 mg/kg

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	f
Zwischen 5' und 10'	1	420,08	420,08	1,32
Zwischen Zeitabschnitten	1	3.620,03	3.620,03	11,39
Quadr. Regression 20'-120'	2	3.770,06	1.885,03	5,93
Rest-Abweichung	3	584,75	194,92	-
Innerhalb Zeiten	40	12.708,98	317,72	
Gesamt-Varianz	47	21.103,90	449,02	

$s_{\bar{x}}$ = 6,3020

BARTLETT-Test: n = 7; x^2 = 6,141

Arithmetische Mittel der Abweichungen

Zeit	$\bar{x}$ (FH)
5'	- 9,50 ± 17,46
10'	- 21,33 ± 17,46
20'	- 16,67 ± 17,46
40'	- 24,67 ± 17,46
60'	- 43,00 ± 17,46
80'	- 42,67 ± 17,46
100'	- 38,67 ± 17,46
120'	- 47,17 ± 17,46

Wirkungs-Integrale

J (20' - 120') = - 183,82 ± 31,65
J (20' - 80') = - 95,20 ± 22,51

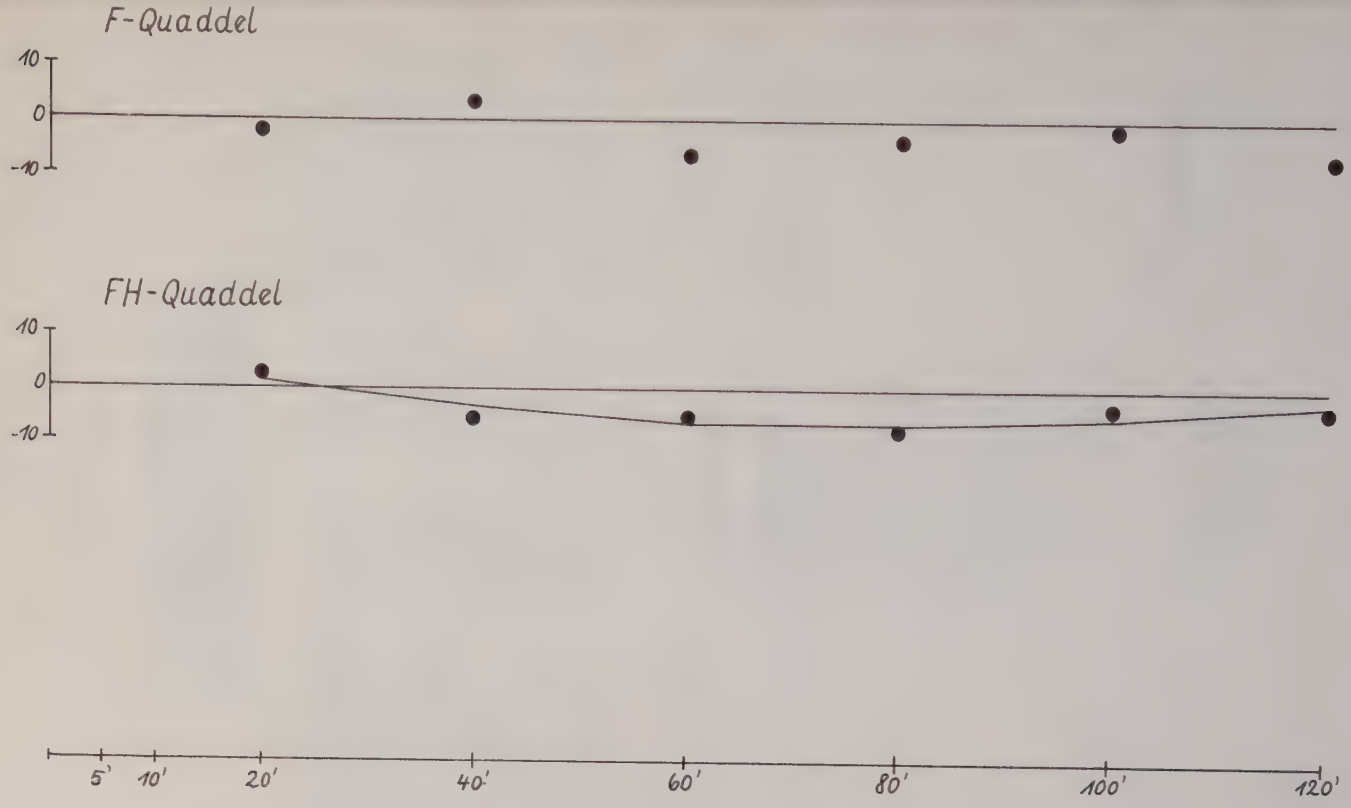


Abb. 1 Abweichungen von den Ausgangswerten

INDOMETACIN 1mg/kg

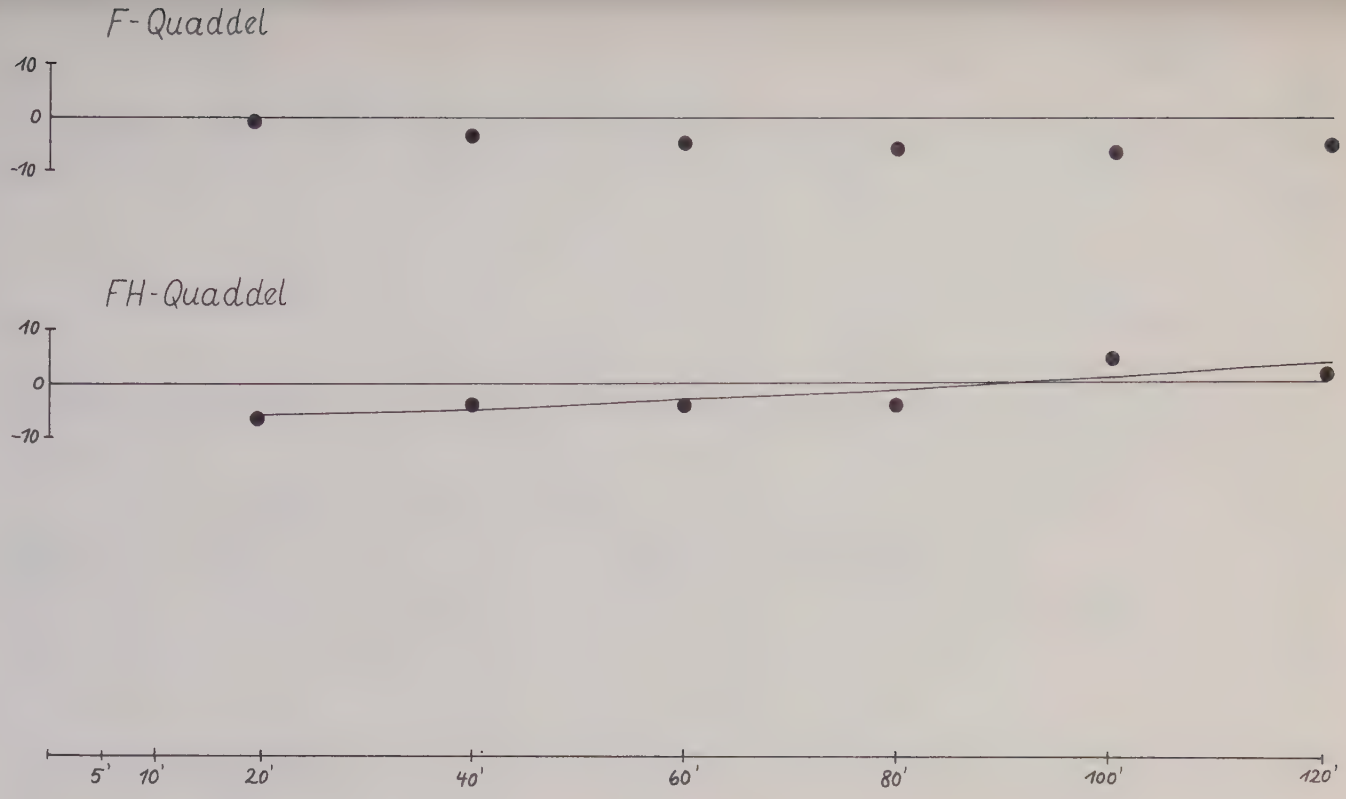


Abb. 11 Abweichungen von den Ausgangswerten

INDOMETACIN 5mg/kg

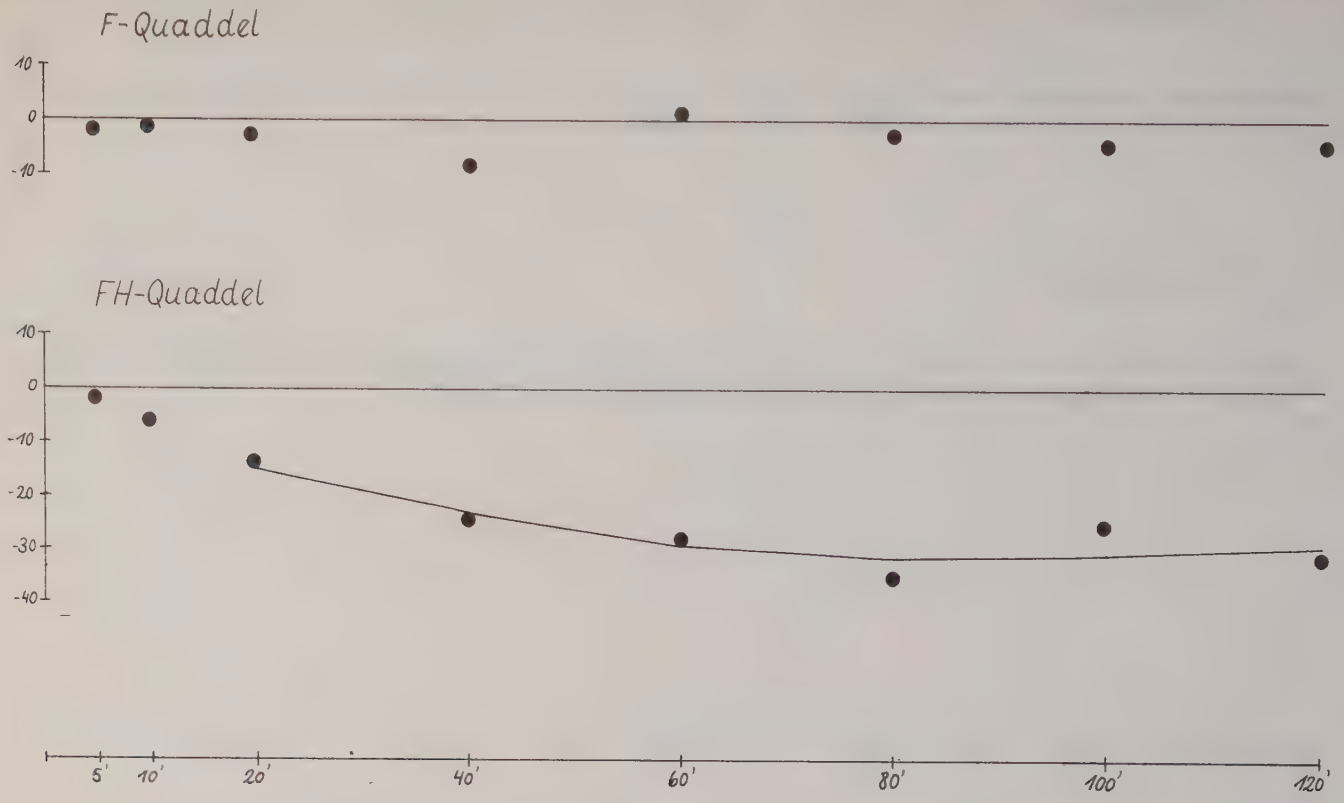


Abb. III

Abweichungen von den Ausgangswerten

INDOMETACIN 7,5 mg/kg

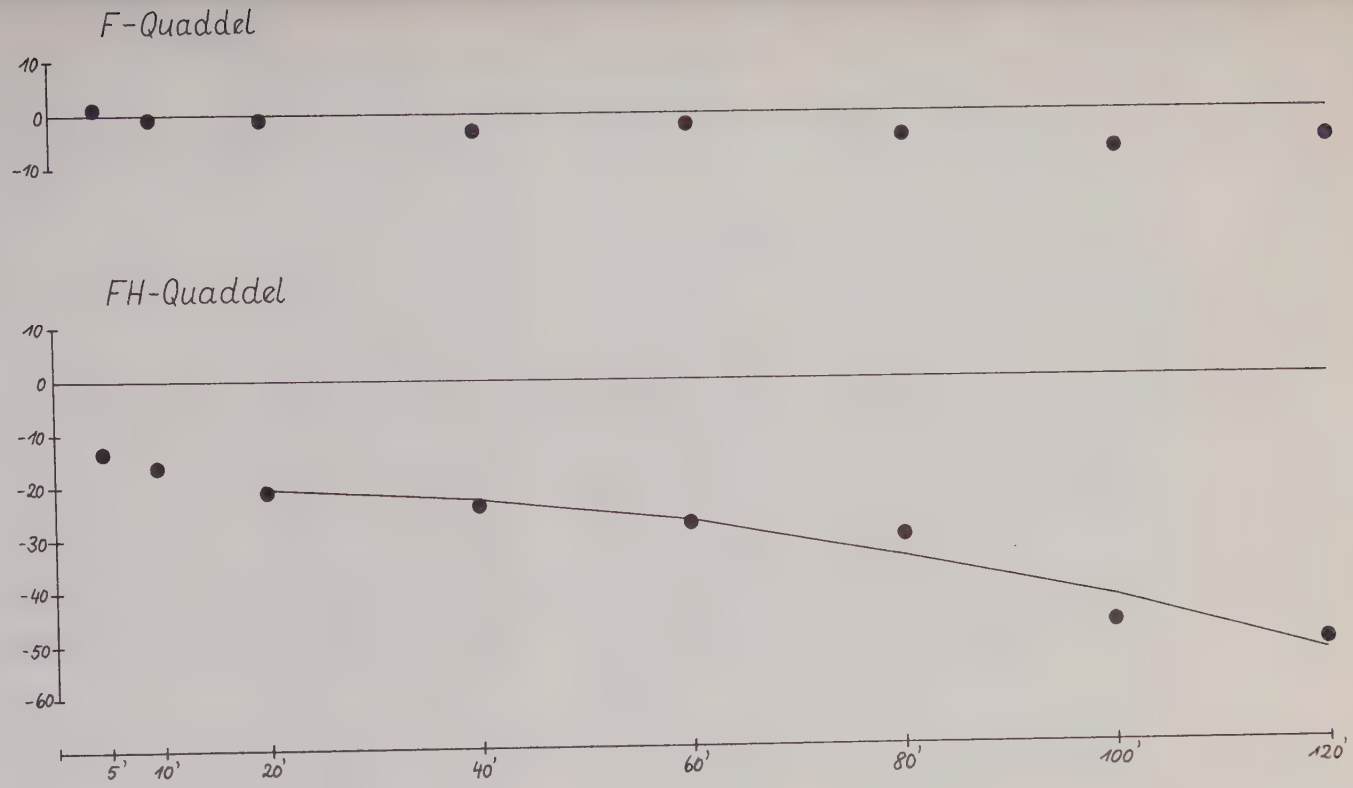


Abb. IV

Abweichungen von den Ausgangswerten

INDOMETACIN 10 mg/kg

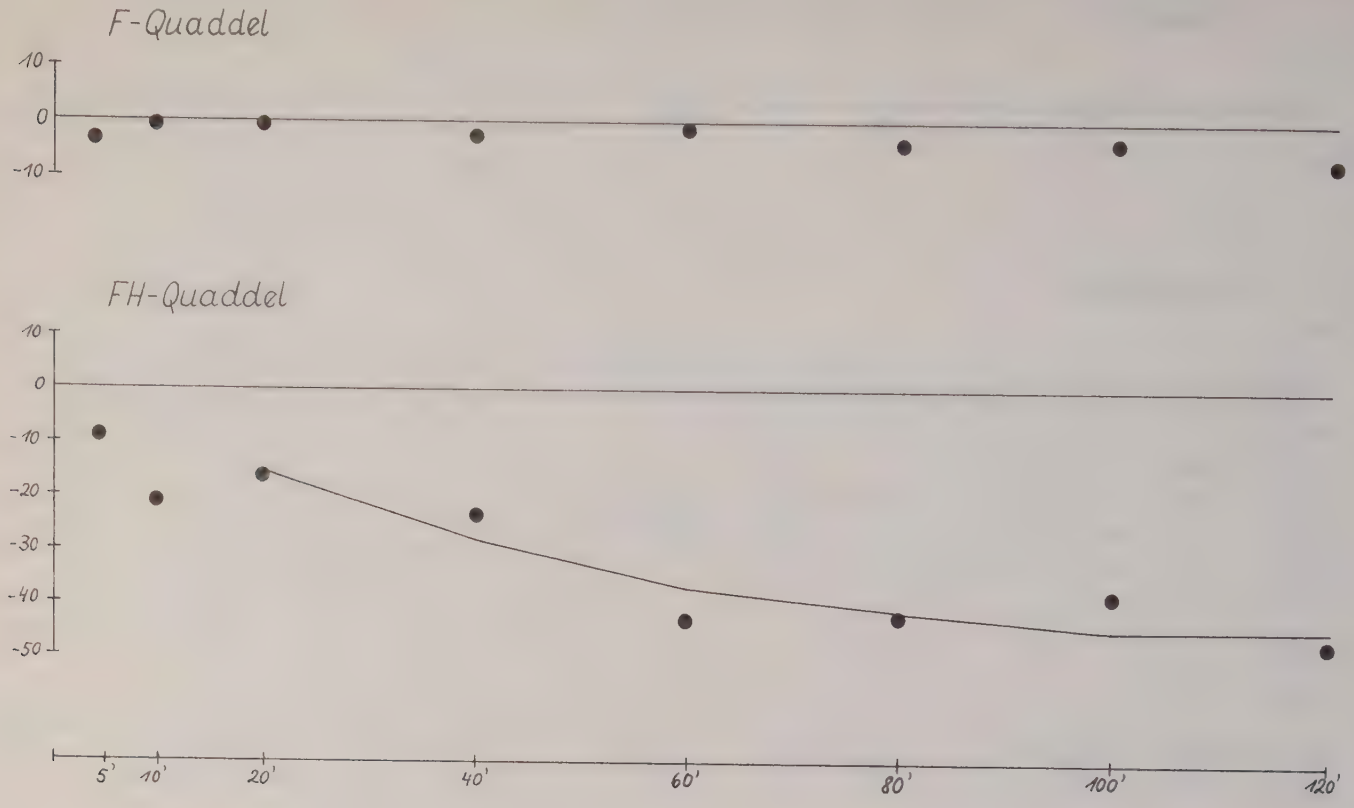


Abb. V

Abweichungen von den Ausgangswerten

INDOMETACIN 100mg/kg

Diskussion

Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß sich durch die intraperitoneale Applikation von Indometacin eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität im Spreading-Test erreichen läßt. Bei einer Dosierung von 100 mg/kg und 10 mg/kg ist ein wesentlicher quantitativer Unterschied bezüglich der Wirkung im Versuchszeitraum nicht festzustellen. Es ist lediglich eine geringgradige Verzögerung der 10-fach niedrigeren Dosis bezüglich des Wirkungsmechanismus bei Betrachtung des Kurvenverlaufs hervorzuheben. Indometacin zeigte in der Dosierung von 7,5 mg/kg ebenfalls eine deutliche Hemmung, die allerdings im Gegensatz zu den obenerwähnten Dosierungen zurückzugehen scheint.

Die Verabreichung von Indometacin in einer noch geringeren Dosis von 5,0 mg/kg läßt keine Hyaluronidasehemmung mehr erkennen. Ebenso verhält es sich mit der Dosierung von 1,0 mg/kg. Bemerkenswert ist, daß bei der Dosierung von 7,5 mg/kg noch eine so deutliche hyaluronidasehemmende Wirkung zu verzeichnen ist, während bei einer Dosis von 5,0 mg/kg keine Hemmung mehr auftritt.

Es wäre zu diskutieren, ob dieser hyaluronidasehemmende Effekt von Indometacin auch bei adrenalektomierten Ratten eintritt oder ob diese hyaluronidasehemmende Wirkung auf demselben Wirkungsmechanismus beruht wie dies bei den Salicylaten, Pyrazolonen, Nebennierenrinden-Hormon-Derivaten usw. der Fall ist. Wie eingangs erwähnt wurde, ist deren hyaluronidasehemmender Effekt mit einer Aktivierung der Nebennierenmark-Katecholamine verbunden.

Zusammenfassung

Mit Hilfe einer auf dem Spreading-Verfahren beruhenden Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddelmethode wurde die hyaluronidasehemmende Wirkung der intraperitoneal injizierten Substanz Indometacin untersucht. Dabei sollte die Dosis gefunden werden, die gerade keine hyaluronidasehemmende Wirkung mehr hervorruft. Diese Grenzdosis dürfte für Indometacin bei 5,0 mg/kg Tiergewicht liegen.

Literaturverzeichnis

1) Mathies, H.: Med. Klin. 52, 1676 (1957)

2) Mathies, H.: Planta Media 2, 129 u. 148

3) Eppinger, H.: Klinik u. Pathologie der Permeabilitätsstörungen Springer Verlag Wien 1944

4) Hollmann, W.: Heilkunst 66, 293 (1953)

5) Epstein, E.L. u. Greenspann, E.B.: Arch. int. Med. Chicago 1077

6) Schoen, R.: 9. Fortbildungskurs (1954) f. ärztl. Fortb., Regensburg Okt. 1952, Dtsch. med. Wschr. 77, 558 (1952)

7) Eppinger, H.: Klinik u. Pathologie der Permeabilitätsstörungen Springer Verlag Wien 1944

8) Evers, A.: zit. Schliephake, E.: Münch. med. Wschr. 97, 56 (1955)

9) Dorfmann, A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 52, 1017 (1950)

10) Terbrüggen, A.: Dtsch. med. J. 5, 312 (1954), Ärztl. Prax. 6, 40 (1954)

11) Rimington, C.: Ann. Rheumat. Dis. 8, 34 (1949

12) Krott, H.: Diss. München 1960

13) Domenjoz, R.: Arch. exp. Path. Pharmakol. 255, 14 (1959)

14) Mathies, H.: Arzneim. Forsch. 8, 233 (1958)

15) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Arzneim. Forsch. 9, 576 (1959)

16) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. 17, 375 (1958)

17) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)

18) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35, 892 (1959)

19) Mathies, H.: Med. Wschr. 11, 791 (1957)

20) Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J. u. Schmidt, D.: Med. exp. 1, 64 (1959)

21) Shen, T. Y., C. A. Winter et al.: J. Amer. chem. Soc. 85, 488 (1963)

22) Winter, C. A.: Arzneimittel - Forsch. (im Druck)

23) Risley, E. A.: Arzneimittel - Forsch. (im Druck)

24) Winter, C. A., E. A. Risley, G. W. Nuss: J. Pharmakol. exp. Ther. 141 369 (1963)

25) Merck, Sharp and Dohme Laboratories: West Point, Pa (USA) unveröffentlichter Bericht

26) Mathies, H., R. Krohn u. B. Werner.: Med. Klinik 46, 1863 (1965)

27) Sicuteri, F.: Internat. Symposion über nichtsteroide Antiphlogistika, Mailand 8. 9. 1964. Excerpta Medica Found. S. Garattini, Amsterdam 1965

28) Sicuteri, F., S. Michelacci, B. Anselmi: Accad. Med. Fisica Fiorentina (Florence) April 1964

29) Sicuteri, F., S. Michelacci, B. Anselmi Settimana med. 52 (1964), 335

30) Madinaveitia, J.: Biochemie J 32, 1806 (1938)

31) Gibian, H.: Erg. d. Enzymforsch. 13, 1 (1954)

32) Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz 13

33) Mathies, H.: Arzneimittel - Forsch. 13, 805 (1963)

Ich danke Herrn Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Privatdozent Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Herrn Dipl.-Math. K.Liebrich bin ich für die Durchführung der statistischen Berechnungen dankbar.

Die Versuchssubstanz Indometacin wurde uns freundlicherweise von der Firma J. R. Geigy A.G., Basel, zur Verfügung gestellt.

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern gewidmet.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 21. 12. 1939 als erstes von zwei Kindern des Kaufmanns Theodor Schürnbrand und dessen Ehefrau Anneliese, geb. Böckel, in Traunstein geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und das Hum. Gymnasium, an dem ich 1960 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommer-Semester 1960 begann ich in München mein medizinisches Studium und bestand dort im Sommer-Semester 1963 die ärztliche Vorprüfung. Im Herbst 1966 beendete ich meine ärztliche Prüfung.